

TRAITE L COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

NOTIFICATION CONCERNANT LA
TRANSMISSION DE DOCUMENTS

Date d'expédition (jour/mois/année)

18 septembre 1996 (18.09.96)

Demande internationale no

PCT/FR95/00250

Date du dépôt international

02 mars 1995 (02.03.95)

Déposant

RHONE-POULENC RORER S.A. etc

Le Bureau international transmet ci-joint le nombre de copies indiqué ci-après des documents suivants:

_____ copie de la traduction en langue anglaise du rapport d'examen préliminaire international (article 36.3)a))

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

C. Boroli

no de téléphone: (41-22) 730.91.11



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Washington D.C. 20231
United States of America

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 04 octobre 1995 (04.10.95)	
Demande internationale no PCT/FR95/00250	Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST 94014
Date du dépôt international (jour/mois/année) 02 mars 1995 (02.03.95)	Date de priorité (jour/mois/année) 18 mars 1994 (18.03.94)
Déposant BARNEOUD, Pascal etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

11 septembre 1995 (11.09.95)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

<p>Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse</p> <p>no de télécopieur: (41-22) 740.14.35</p>	<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p>I. Hours</p> <p>no de téléphone: (41-22) 730.91.11</p>
---	---



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No
PCT/FR 95/00250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C07K14/475 C12N7/01
C12N5/10 A61K39/235

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCE, vol.259, 12 February 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' see the whole document --- -/-	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 May 1995

Date of mailing of the international search report

09.06.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat 1 Application No
PCT/FR 95/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' see the whole document	1-26
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1er au 3 Juin 1993 ---	1-26
P,Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 March 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,94 03199 (REGENERON PHARM. INC.) 17 February 1994 see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,93 08828 (GENERAL HOSPITAL CORP. & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 May 1993 see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,93 01300 (MAX PLANCK GES. FÖRDERUNG WIISE & REGENERON PHARM INC.) 21 January 1993 see the whole document ---	1-26
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 September 1993 see claims ---	1-26
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 April 1994 see the whole document ---	1-26
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, February 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' see the whole document ---	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internu 1 Application No
PCT/FR 95/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, September 1992, AMSTERDAM NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' see page 218, column 2, paragraph 3 - page 219, column 1, paragraph 1 ---</p>	1
T	<p>WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 27 October 1994 see the whole document ---</p>	1
A	<p>BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' see the whole document ---</p>	1
A	<p>SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 June 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' see the whole document -----</p>	1

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR95/00250

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. STATEMENT

Novelty (N)	Claims	<u>1-26</u>	YES
	Claims		NO
Inventive Step (IS)	Claims		YES
	Claims	<u>1-26</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims	<u>1-26</u>	YES
	Claims		NO

2. CITATIONS AND EXPLANATIONS

1) The following documents (D) were taken into account for establishing the preliminary examination report:

D1: FR-A-2 688 514

D2: WO-A-93/01300

D3: WO-A-93/08828

D4: Science, vol. 259, No. 5097, pages 988-990

D5: Nouvelle Revue Française d'Hématologie, vol. 35, No. 3, pages 299-300.

D6: European Journal of Biochemistry, vol. 208, No. 2, pages 211-225.

2) The present application does not meet the criterion stated in Article 33(3) PCT, the subject of claims 1, 15, 17, 20 and 23 not involving an inventive step (Rule 65(1) (2) PCT).

The use, as therapeutic agents, of defective recombinant adenoviruses carrying a heterologous gene appears to be widespread. In this context, D1 describes the use of a defective adenovirus containing an insert encoding a cytokine under the control of an adenovirus promoter as antitumour agent.

As is recognized by the Applicant on pages 1 and 2, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was known and characterized before the priority date of the application in this instance. Documents D2 and D3 describe methods for treating neuronal diseases in which this factor is directly injected into the patient.

Documents D4 and D5 demonstrate that a recombinant defective adenovirus is also capable of carrying out the transfer of a gene of interest into the intrinsic cells of the central nervous system. These documents show the great infectability of all the cells of the central nervous system which is observed in vivo after injection of such a type of vector as well as the persistence of the expression of the gene transferred for

several months. In the light of the results obtained, it is suggested in these documents to use this type of vector in the treatment of neurological diseases, in particular neurodegenerative diseases.

The advantages linked to the use of an adenovirus compared with other vectors, especially retroviruses, are summarized in Table 1 of D6. Although it appears, according to D6, that the vectors whose use was most widespread on the date of publication of D6 were retroviruses, it is clear that in the light of the disadvantage of the latter not being capable of infecting cells which are not in a dividing phase, a person skilled in the art searching for a vector capable of infecting neuronal cells would rather have chosen a vector of the adenovirus type. Furthermore, the construction of a vector of the defective recombinant adenovirus type comprising a heterologous gene is illustrated and described in Figure 3 of D6.

A person skilled in the art, knowing through D2-D3 the therapeutic values of BDNF in the treatment of neurodegenerative diseases and trying to develop a therapeutic agent which

is both free of the disadvantages linked to a direct injection and capable of infecting cells which are not dividing, would therefore have been tempted to follow the suggestion of D4-D6 by using, as vector, a defective recombinant adenovirus into whose genome he would have integrated the gene encoding BDNF.

For these reasons, the adenovirus thus obtained, its therapeutic use as well as a cell infected by such an adenovirus and an implant comprising several of these cells are considered as lacking an inventive step.

- 3) The characteristics of the dependent claims 2 to 14, 16, 18, 19, 21, 22 and 24-26 being either purely conventional or suggested to a person skilled in the art by the abovementioned documents, these claims are also considered as not responding to the criterion stated in article 33(3) PCT.
- 4) This examination is based on the assumption that all the claims benefit from a right of priority dating from the filing of the priority document. If this proved not to be the case, the documents "Neuroreport, vol. 4, no. 7, pages 801-804", "WO-A-94/08026", "WO-A-94/24297" and "Brain Research, vol.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR95/00250

548, no. 1, 1994, pages 171-175" (whose publication date appears to be later than the priority date of the application) cited in the international search report could become pertinent.

- 5) The subject of claims 1 to 26 is capable of industrial application as defined by article 33(4) PCT.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR95/00250

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Documents D1-D6 were not cited in the description and the prior state of the art which they contain was not discussed either. The provisions of Rule 5.1(a)(ii) PCT are therefore not observed.

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TRANSLATION

Applicant's or agent's file reference ST 94014	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR95/00250	International filing date (day/month/year) 02/03/1995	Priority date (day/month/year) 18/03/1994
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N15/86		
Applicant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 11/09/1995	Date of completion of this report 13.06.96
Name and mailing address of the IPEA/ EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*

- ☒ the international application as originally filed.
- ☐ the description, pages _____, as originally filed.
pages _____, filed with the demand.
pages _____, filed with the letter of _____
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims. Nos. _____, as originally filed.
Nos. _____, as amended under Article 19.
Nos. _____, filed with the demand.
Nos. _____, filed with the letter of _____
Nos. _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed.
sheets/fig _____, filed with the demand.
sheets/fig _____, filed with the letter of _____
sheets/fig _____, filed with the letter of _____

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-26	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-26	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-26	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

- 1). The following documents (D) were taken into consideration when drawing up the present preliminary examination report:

D1: FR-A-2 688 514

D2: WO-A-93/01300

D3: WO-A-93/08828

D4: Science, 259, 1993, No. 5097, pages 988-990.

D5: Nouvelle Revue Française d'Hématologie, Vol.35, No.3, 1993, pages 299-300.

D6: European Journal of Biochemistry, Vol.208, No.2, pages 211-225.

- 2) The present application does not comply with the requirements of PCT Article 33 (3), since the subject matter of Claims 1, 15, 17, 20 and 23 does not involve an inventive step (PCT Rule 65.1, 65.2).

The use of defective recombinant adenoviruses carrying a heterologous gene as therapeutic agents appears to be widespread. In this connection, D1 describes the use of a defective adenovirus containing an insert coding for a cytokin under the control of a promotor of the adenovirus as an anti-tumoral agent.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT PCT/FR95/00250

As acknowledged by the applicant on pages 1 and 2, the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was known and characterized before the priority date of the present application. Documents D2 and D3 describe methods for treating neuronal diseases in which this factor is directly injected into the patient.

Documents D4 and D5 disclose that a recombinant defective adenovirus is also able to effect the transfer of a gene of interest into the intrinsic cells of the central nervous system. These documents show the high infectability of all the cells of the central nervous system, which is observed in vivo after injection of such a type of vector, as well as the persistence of the expression of the transferred gene for a period of several months. On the basis of the results obtained, these documents suggest that this type of vector be used for the treatment of neurological diseases, in particular for neuro-degenerative diseases.

The advantages of using an adenovirus as compared with other vectors, in particular retroviruses, are summarized in Table 1 of D6. Although it would appear from D6 that the most widely used vectors at the publication date of D6 were retroviruses, it is clear that, because the latter suffered from the disadvantage of not being able to infect cells which are not in a division phase, a person skilled in the art seeking a vector able to infect neuronal cells would be more likely to choose a vector of the adenovirus type. Furthermore, the construction of a recombinant adenovirus type vector comprising a heterologous gene is illustrated and commented on in

Figure 3 of D6.

A person skilled in the art who learns from documents D2 - D3 of the therapeutic virtues of BDNF in the treatment of neurodegenerative diseases and who is seeking to develop a therapeutical agent which is not only free from the disadvantages associated with direct injection but is also able to infect cells which are not undergoing division would therefore have been tempted to follow the suggestion of D4 - D6, using, as the vector, a defective recombinant adenovirus, and would have inserted in the genome of the latter the gene coding for BDNF.

For the above reasons, the adenovirus thus obtained, its therapeutical use, together with a cell infected by such an adenovirus and an implant comprising several of these cells, are considered to be lacking in inventive step.

- 3) Since the features of dependent Claims 2 to 14, 16, 18, 19, 21, 22 and 24-26 are either purely conventional or are suggested to a person skilled in the art by the above-mentioned documents, these claims are likewise considered not to comply with the requirements of PCT Article 33 (3).
- 4) This examination report is based on the assumption that all claims enjoy the priority of the filing date of the priority document. Should this prove to be incorrect, the documents cited in the international search report: "Neuroreport, Vol. 4, No.7, pages 801-804", "WO-A-94/08026", "WO-A-94/24297" and "Brain Research, Vol. 548, No.1, pages 171-175 (whose

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT PCT/FR95/00250

publication date appears to be later than the priority date of the application) could become relevant.

- 5) The subject matter of Claims 1 to 26 is industrially applicable as defined in PCT Article 33 (4).

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The description has not cited documents D1 to D6 or briefly outlined the relevant state of the art contained therein. The requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii) are therefore not satisfied.

REC'D 17 JUN 1996

WIPO

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST 94014	POUR SUITE A DONNER		Avec la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/PEA 416)
Demande internationale n° PCT/FR 95/ 00250	Date du dépôt international (jour mois année) 02/03/1995	Date de priorité (jour, mois année) 18/03/1994	
Classification internationale des brevets (CIB) ou classification nationale et CIB C12N15/86			
Déposant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.			

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.



2. Ce RAPPORT comprend 8 feuilles, y comprise la présente feuille de couverture.

☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent _____ feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☒ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire international 11/09/1995	Date de dépôt du présent rapport 13 JUN 1996
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office Européen des Brevets D-80298 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Fonctionnaire autorisé  V. Kaas N° de téléphone

I. Base du rapport

1. Le présent rapport a été rédigé sur la base des éléments ci-après (Les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications.):

☒ de la demande internationale telle qu'initialement déposée.

☐ de la description, pages _____, telles qu'initialement déposées,
pages _____, déposées avec la demande d'examen
préliminaire international,
pages _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,
pages _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,

☐ des revendications, nos. _____, telles qu'initialement déposées,
nos. _____, telles que modifiées en vertu de
l'article 19,
nos. _____, déposées avec la demande d'examen
préliminaire international,
nos. _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,
nos. _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,

☐ des dessins, feuilles/fig _____, telles qu'initialement déposées,
feuilles/fig _____, déposées avec la demande d'examen
préliminaire international,
feuilles/fig _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,
feuilles/fig _____, déposées sous couvert d'une lettre
du _____,

2. Les modifications ont entraîné l'annulation

☐ de la description, pages _____

[] des revendications, nos. _____.

[] des dessins, feuilles/fig. _____.

3. [] Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé (règle 70.2.c)).

4. Observations complémentaires, le cas échéant:



;

V. Déclaration motivée selon l'article 35.2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. DECLARATION

Nouveauté	Revendications 1-26 _____	OUI
	Revendications _____	NON
Activité inventive	Revendications _____	OUI
	Revendications 1-26 _____	NON
Possibilité d'application industrielle	Revendications 1-26 _____	OUI
	Revendications _____	NON

2. CITATIONS ET EXPLICATIONS

- 1) Les documents (D) suivants ont été pris en compte pour l'établissement du rapport d'examen préliminaire:

D1 : FR-A-2 688 514

D2 : WO-A-93/01300

D3 : WO-A-93/08828

D4 : Science, vol. 259, n° 5097, pages 988-990

D5 : Nouvelle Revue Française d'Hématologie, vol. 35, n° 3, pages 299-300.

D6 : European Journal of Biochemistry, vol. 208, n° 2, pages 211-225.

- 2) La présente demande ne répond pas au critère figurant à l'Article 33(3) PCT, l'objet des revendications 1, 15, 17, 20 et 23 n'impliquant pas d'activité inventive (Règle 65(1)(2) PCT).

L'utilisation comme agents thérapeutiques d'adénovirus recombinant défectifs porteurs d'un gène hétérologue

semble largement répandue. Dans ce cadre, D1 décrit l'utilisation d'un adénovirus défectif contenant un insérat codant pour une cytokine sous contrôle d'un promoteur de l'adénovirus comme agent anti-tumoral.

Comme cela est reconnu par la Demanderesse aux pages 1 et 2, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) était connu et caractérisé avant la date de priorité de la demande en instance. Les documents D2 et D3 décrivent des méthodes de traitement des maladies neuronales dans lesquelles ce facteur est directement injecté au patient.

Les documents D4 et D5 démontrent qu'un adénovirus défectif recombinant est également capable d'effectuer le transfert d'un gène d'intérêt dans les cellules intrinsèques du système nerveux central. Ces documents montrent la grande infectabilité de toutes les cellules du système nerveux central observée in vivo après injection d'un tel type de vecteur ainsi que la persistance de l'expression du gène transféré pendant plusieurs mois. Au vu des résultats obtenus, il est suggéré dans ces documents d'utiliser ce type de vecteur dans le traitement de maladies neurologiques, en particulier les maladies neuro-dégénératives.

Les avantages liés à l'utilisation d'un adénovirus par rapport à d'autres vecteurs, notamment les rétrovirus, sont résumés dans le Tableau 1 de D6. Bien qu'il apparaisse d'après D6 que les vecteurs dont l'utilisation était la plus répandue à la date de publication de D6 étaient les rétrovirus, il est clair qu'au vu du désavantage de ces derniers de ne pas être capables d'infecter des cellules qui ne sont pas en phase de division, le choix de la personne du métier cherchant un vecteur capable d'infecter des cellules neuronales se serait plutôt porté sur un vecteur du type



adénovirus. De plus, la construction d'un vecteur de type adénovirus recombinant défectif comprenant un gène hétérologue est illustrée et commentée à la Figure 3 de D6.

La personne du métier connaissant par D2-D3 les vertus thérapeutiques de BDNF dans le traitement des maladies neurodégénératives et cherchant à mettre au point un agent thérapeutique qui soit à la fois exempt des désavantages liés à une injection directe et capable d'infecter des cellules qui ne sont pas en division, aurait donc été tentée de suivre la suggestion de D4-D6 en utilisant comme vecteur un adénovirus recombinant défectif dans le génôme duquel il aurait intégré le gène codant pour BDNF.

Pour ces raisons, l'adénovirus ainsi obtenu, son utilisation thérapeutique ainsi qu'une cellule infectée par un tel adénovirus et un implant comprenant plusieurs de ces cellules sont considérés comme dépourvus d'activité inventive.

- 3) Les caractéristiques des revendications dépendantes 2 à 14, 16, 18, 19, 21, 22 et 24-26 étant soit purement conventionnelles soit suggérées à la personne du métier par les documents sus-mentionnés, ces revendications sont également considérées comme ne répondant pas au critère figurant à l'Article 33(3) PCT.
- 4) Cet examen est fondé sur l'assomption que toutes les revendications jouissent d'un droit de priorité datant du dépôt du document de priorité. S'il s'avérait qu'il n'en était pas ainsi, les documents "Neuroreport, vol. 4, no. 7, pages 801-804", "WO-A-94/08026", "WO-A-94/24297" et "Brain Research, vol. 548, no. 1,



1994, pages 171-175" (dont la date de publication semble postérieure à la date de priorité de la demande) cités dans le rapport de recherche internationale pourraient devenir pertinents.

- 5) L'objet des revendications 1 à 26 est susceptible d'application industrielle telle que définie par l'Article 33(4) PCT.

VII. Irrégularités dans la demande internationale

Les irrégularités suivantes, concernant la forme ou le contenu de la demande internationale, ont été constatées:

Les documents D1-D6 n'ont pas été cités dans la description et l'état de la technique qu'ils renferment n'a pas non plus été discuté. Les dispositions de la Règle 5.1(a)(ii) PCT ne sont donc pas observées.

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST 94014	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR95/00250	Date du dépôt international (jour/mois/année) 02/03/95	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 18/03/94
Déposant RHONE-POULENC RORER S.A. et al.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 4 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

- ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).
- ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).
- ☒ La demande internationale contient la divulgation d'un listage de séquence de nucléotides ou d'acides aminés et la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage de séquence.
 - ☒ déposé avec la demande internationale
 - ☐ fourni par le déposant séparément de la demande internationale
 - ☐ sans être accompagnée d'une déclaration selon laquelle il n'inclut pas d'éléments allant au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle qu'elle a été déposée.
 - ☐ transcrit par l'administration

- En ce qui concerne le titre, ☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.
☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LE FACTEUR NEUROTROPHIQUE DERIVE DU CERVEAU (BDNF).

- En ce qui concerne l'abrégé,
 - ☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant
 - ☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

- La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la suivante:

Figure n° 2 ☐ suggérée par le déposant.
☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.
☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

FR 95/00250

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C07K14/475 C12N7/01
 C12N5/10 A61K39/235

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>SCIENCE, vol.259, 12 Février 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' voir le document en entier --- -/--</p>	1-26

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Mai 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

- 9. 06. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' voir le document en entier	1-26
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1er au 3 Juin 1993 ---	1-26
P,Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 Mars 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,94 03199 (REGENERON PHARM. INC.) 17 Février 1994 voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,93 08828 (GENERAL HOSPITAL CORP. & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 Mai 1993 voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,93 01300 (MAX PLANCK GES. FÖRDERUNG WIISE & REGENERON PHARM INC.) 21 Janvier 1993 voir le document en entier ---	1-26
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 Septembre 1993 voir revendications ---	1-26
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 Avril 1994 voir le document en entier ---	1-26
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, Février 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' voir le document en entier ---	1
	--- -/--	

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, Septembre 1992, AMSTERDAM . NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' voir page 218, colonne 2, alinéa 3 - page 219, colonne 1, alinéa 1 ---</p>	1
T	<p>WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 27 Octobre 1994 voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' voir le document en entier ---</p>	1
A	<p>SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 Juin 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' voir le document en entier -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9403199	17-02-94	AU-B- 4995193	03-03-94
WO-A-9308828	13-05-93	AU-A- 3129793	07-06-93
WO-A-9301300	21-01-93	AU-A- 2009592	11-02-93
		CA-A- 2113083	11-01-93
		EP-A- 0593516	27-04-94
		FI-A- 940098	10-03-94
		JP-T- 6509094	13-10-94
		NO-A- 940083	18-02-94
		NO-A- 940084	08-03-94
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		WO-A- 9319191	30-09-93
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B- 4818093	26-04-94
		NO-A- 951121	23-03-95
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A- 2704234	28-10-94
		AU-B- 6572194	08-11-94



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A61K 48/00, C12N 15/12, C07K 14/475, C12N 7/01, 5/10, A61K 39/235	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/25804 (43) Date de publication internationale: 28 septembre 1995 (28.09.95)
---	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00250

(22) Date de dépôt international: 2 mars 1995 (02.03.95)

(30) Données relatives à la priorité:
94/03191 18 mars 1994 (18.03.94) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BARNEAUD, Pascal [FR/FR]; 1, avenue Anatole-France, F-94600 Choisy-le-Roi (FR); DELAERE, Pia [BE/FR]; 108 bis, boulevard Auguste-Blanqui, F-75013 Paris (FR); PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR); PRADIER, Laurent [FR/FR]; 5 bis, rue d'Alésia, F-75014 Paris (FR); VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-Le Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR).

(74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).

(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: RECOMBINANT ADENOVIRUSES CODING FOR BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF)

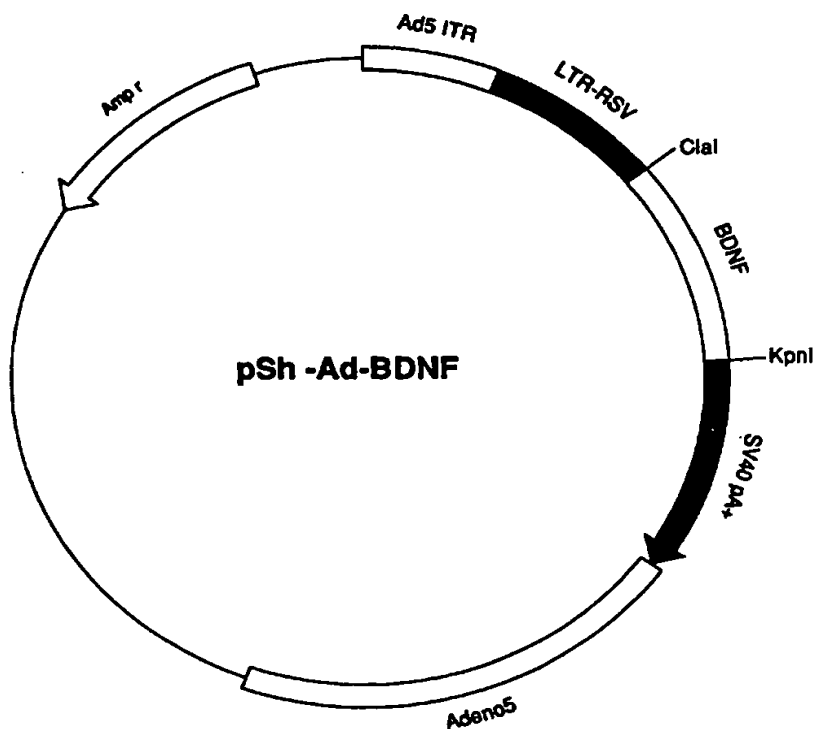
(54) Titre: ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LE FACTEUR NEUROTROPHIQUE DERIVE DU CERVEAU (BDNF)

(57) Abstract

Recombinant adenoviruses comprising a heterologous DNA sequence coding for brain-derived neurotrophic factor (BDNF), preparation thereof, and use thereof for treating and/or preventing degenerative neurological diseases.

(57) Abrégé

La présente invention concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN hétérologue codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), leur préparation, et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ADENOVIRUS RECOMBINANTS CODANT POUR LE FACTEUR NEUROTROPHIQUE DERIVE DU CERVEAU (BDNF)

La présente invention concerne des vecteurs recombinants d'origine virale et leur utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

5 Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, "brain-derived neurotrophic factor"). L'invention concerne également la préparation de ces vecteurs, les compositions pharmaceutiques les contenant et leur utilisation thérapeutique, notamment en thérapie génique.

10 Les maladies neurodégénératives représentent une large part des dépenses de santé dans les pays occidentaux, part qui ne cesse de s'accroître suite au vieillissement de la population. Au titre de ces affections, on peut citer notamment la maladie d'Alzheimer, le maladie de Parkinson, la chorée de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, etc. Les signes pathologiques et l'étiologie de ces maladies sont fort
15 variés, mais toutes ces maladies résultent d'une perte progressive de cellules neuronales dans le système nerveux central, parfois au sein de structure très localisées comme la substance noire dans la maladie de Parkinson. Bien que certains traitements pharmacologiques palliatifs soient déjà disponibles, leurs effets sont relativement limités. La présente invention décrit une approche thérapeutique nouvelle,
20 particulièrement avantageuse pour le traitement de ces maladies. Plus particulièrement, la présente invention décrit des vecteurs permettant de promouvoir directement la survie des cellules neuronales impliquées dans ces pathologies, par expression efficace et localisée de certains facteurs trophiques.

Les facteurs trophiques sont une classe de molécules ayant des propriétés de
25 stimulation de la croissance neuritique ou de la survie des cellules nerveuses. Le premier facteur possédant des propriétés neurotrophiques, le NGF ("Nerve Growth Factor"), a été caractérisé il y a une quarantaine d'années (pour revue, voir Levi-Montalcini et Angelletti, *Physiol. Rev.* 48 (1968) 534). Ce n'est que récemment que d'autres facteurs neurotrophiques ont été identifiés, et notamment le facteur
30 neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Thoenen, *Trends in NeuroSci.* 14 (1991) 165). Le BDNF est une protéine de 118 acides aminés et de poids moléculaire 13,5 kD. In vitro, le BDNF stimule la formation de neurites et la survie en culture des neurones ganglionnaires de la rétine, des motoneurones de la moelle épinière, des

neurones cholinergiques du septum ainsi que des neurones dopaminergiques du mésencéphale (revue par Lindsay in Neurotrophic Factors, Ed, (1993) 257, Academic Press). Toutefois, bien que ses propriétés soient intéressantes, l'application thérapeutique du BDNF se heurte à différents obstacles. En particulier, l'absence de biodisponibilité du BDNF limite toute utilisation thérapeutique. Par ailleurs, il n'existe pas de moyens efficaces permettant de délivrer le BDNF de manière durable et localisée à certaines régions désirées de l'organisme. Enfin, il est essentiel que le BDNF délivré soit actif et puisse exercer une activité thérapeutique in vivo.

La présente invention apporte une solution particulièrement avantageuse à ces problèmes. La présente invention réside en effet dans la mise au point de vecteurs particulièrement efficaces pour délivrer in vivo et de manière localisée, des quantités thérapeutiquement actives de BDNF. Dans la demande copendante n° PCT/EP93/02519, il a été montré que les adénovirus pouvaient être utilisés pour le transfert de gènes in vivo dans le système nerveux. La présente invention concerne des constructions nouvelles, particulièrement adaptées et efficaces pour le transfert d'un gène spécifique dans le système nerveux. Plus particulièrement, la présente invention concerne un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), sa préparation, et son utilisation pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

La demanderesse a maintenant montré qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF, d'administrer ces adénovirus recombinants in vivo, et que cette administration permet une expression stable et localisée de quantités thérapeutiquement actives de BDNF in vivo, et en particulier dans le système nerveux, et sans effet cytopathologique. Les propriétés particulièrement avantageuses des vecteurs de l'invention découlent notamment de la construction utilisée (adénovirus déficient, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour le BDNF (promoteur viral ou tissu-spécifique de préférence), et des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés du BDNF. La présente invention fournit ainsi des vecteurs viraux utilisables directement en thérapie génique, particulièrement adaptés et efficaces pour diriger l'expression du BDNF in vivo. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement avantageuse pour le traitement et/ou la prévention des maladies neurodégénératives.

Un premier objet de l'invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel adénovirus recombinant défectif pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

Le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) produit dans le cadre de la présente invention peut être le BDNF humain ou un BDNF animal. La séquence d'ADN codant pour le BDNF humain et pour le BDNF de rat a été clonée et séquencée (Maisonpierre et al., Genomics 10 (1991) 558), ainsi que notamment la séquence codant pour le BDNF de porc (Leibrock et al., Nature 341 (1989) 149). Préalablement à leur incorporation dans un vecteur adénovirus selon l'invention, ces séquences sont avantageusement modifiées, par exemple par mutagénèse dirigée, en particulier pour l'insertion de sites de restriction appropriés. Les séquences décrites dans l'art antérieur ne sont en effet pas construites pour une utilisation selon l'invention, et des adaptations préalables peuvent s'avérer nécessaires, pour obtenir des expressions importantes (voir exemple 1.2.). Dans le cadre de la présente invention, on préfère utiliser une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF). Par ailleurs, comme indiqué ci-avant, il est également possible d'utiliser une construction codant pour un dérivé du BDNF, en particulier un dérivé du BDNF humain. Un tel dérivé comprend par exemple toute séquence obtenue par mutation, délétion et/ou addition par rapport à la séquence native, et codant pour un produit conservant l'une au moins des propriétés biologiques du BDNF (effet trophique et/ou différenciateur). Ces modifications peuvent être réalisées par les techniques connues de l'homme du métier (voir techniques générales de biologie moléculaire ci-après et exemple 2). L'activité biologique des dérivés ainsi obtenus peut ensuite être aisément déterminée, comme indiqué notamment dans l'exemple 3.. Les dérivés au sens de l'invention peuvent également être obtenus par hybridation à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde la séquence native ou un fragment de celle-ci.

Ces dérivés sont notamment des molécules ayant une plus grande affinité pour leurs sites de fixation, des séquences permettant une expression améliorée in vivo, des molécules présentant une plus grande résistance aux protéases, des molécules

ayant une efficacité thérapeutique plus grande ou des effets secondaires moindres, ou éventuellement de nouvelles propriétés biologiques.

Parmi les dérivés préférés, on peut citer plus particulièrement les variants naturels, les molécules dans lesquelles un ou plusieurs résidus ont été substitués, les dérivés obtenus par délétion de régions n'intervenant pas ou peu dans l'interaction avec les sites de liaison considérés ou exprimant une activité indésirable, et les dérivés comportant par rapport à la séquence native des résidus supplémentaires, tels que par exemple un signal de sécrétion et/ou un peptide de jonction. De manière particulièrement avantageuse, la séquence de la présente invention code pour le BDNF précédé de la région pro native (proBDNF).

Par ailleurs, il est particulièrement important pour une meilleure mise en oeuvre de la présente invention que la séquence utilisée contienne également un signal de sécrétion permettant de diriger le BDNF synthétisé dans les voies de sécrétion des cellules infectées, de manière à ce que le BDNF synthétisé soit libéré dans les compartiments extracellulaires et puisse activer ses récepteurs. Le signal de sécrétion est avantageusement le propre signal du BDNF. Mais il peut également s'agir d'un signal de sécrétion hétérologue ou même artificiel.

La séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau utilisée dans le cadre de la présente invention peut être un ADNc, un ADN génomique (ADNg), ou une construction hybride consistant par exemple en un ADNc dans lequel seraient insérés un ou plusieurs introns. Il peut également s'agir de séquences synthétiques ou semisynthétiques. Il est à noter que dans la séquence génomique codant pour le BDNF, les introns sont localisés dans les régions non codantes. De manière particulièrement avantageuse, on utilise un ADNc ou un ADNg. En particulier, l'utilisation d'un ADNg peut permettre une meilleure expression dans les cellules humaines.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, l'adénovirus comprend donc une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'adénovirus comprend une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Avantageusement, la séquence d'ADN code pour le proBDNF et, de préférence, le préproBDNF.

Avantageusement, la séquence codant pour le BDNF est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du BDNF. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules nerveuses, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule nerveuse. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs de l'énolase neurone-spécifique, de la GFAP, etc.

Dans un premier mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.

La demanderesse a en effet montré que le promoteur LTR du virus du sarcome de rous (RSV) permettait une expression durable et importante du BDNF dans les cellules du système nerveux, notamment central.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux. Un mode particulièrement préféré de mise en oeuvre de la présente invention réside dans un adénovirus recombinant défectif comprenant les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, une séquence d'ADN codant pour le facteur

neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans le système nerveux, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 est non fonctionnel.

5 Les adénovirus défectifs selon l'invention sont des adénovirus incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible. Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non
10 fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence d'ADN codant pour le BDNF.

Préférentiellement, le virus défectif de l'invention conserve les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales. Encore plus
15 préférentiellement, comme indiqué ci-avant, le génome du virus recombinant défectif selon l'invention comprend les séquences ITR, une séquence permettant l'encapsidation, le gène E1 non fonctionnel et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 non fonctionnel.

Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la
20 présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De
25 préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

30 Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour le BDNF. La recombinaison homologue se
35 produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire

appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus déficient, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596 qui sont incorporées à la présente par référence.

10 Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Comme indiqué ci-avant, la présente invention concerne également toute utilisation d'un adénovirus tel que décrit ci-dessus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, elle concerne toute utilisation de ces adénovirus pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer, de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), de la maladie d'Huntington, de l'épilepsie et de la démence vasculaire.

20 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans le système nerveux du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans le système nerveux du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés. L'injection directe dans le système nerveux central du patient est avantageusement réalisée au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi d'un tel appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection.

A cet égard, l'invention concerne également une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration à un patient d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de traitement des maladies neurodégénératives comprenant l'administration stéréotaxique d'un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Les doses d'adénovirus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, puis mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Un autre objet de l'invention concerne toute cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs tels que décrits ci-dessus. Plus particulièrement, l'invention concerne toute population de cellules humaines infectée par ces adénovirus. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, cellules gliales, etc.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'infection par les adénovirus, ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies.

Les cellules en culture sont ensuite infectées par des adénovirus recombinants, pour leur conférer la capacité de produire du BDNF. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre

de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses d'adénovirus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules mammifère infectées par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs telles que décrites ci-dessus, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 .

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique.

Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central,

ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils permettent de contrôler la libération du produit thérapeutique dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulable, permettant d'induire ou de réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

La présente invention offre ainsi un moyen très efficace pour le traitement ou la prévention des maladies neurodégénératives. Elle est tout particulièrement adaptée au traitement des maladies d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington, et de l'ALS. Les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, liés notamment à leur très haute efficacité d'infection des cellules nerveuses, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale. De plus, l'infection par les adénovirus de l'invention est très localisée au site d'injection, ce qui évite les risques de diffusion aux structures cérébrales voisines.

En outre, ce traitement peut concerner aussi bien l'homme que tout animal tel que les ovins, les bovins, les animaux domestiques (chiens, chats, etc), les chevaux, les poissons, etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pXL2244

Figure 2 : Représentation du vecteur pSh-Ad-BDNF

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extractions de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory,

Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

5 Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

10 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

15 La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-
20 1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en
25 utilisant le kit distribué par Amersham.

Exemples

Exemple 1 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).
30

1.1. Vecteur de départ (pXL2244) : Le plasmide pXL2244 contient l'ADNc de l'ApoAI sous le contrôle du promoteur LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 (figure 1). Il a été construit par insertion d'un fragment ClaI-EcoRV

contenant l'ADNc codant pour la préproApoAI dans le vecteur pLTR RSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), digéré par les mêmes enzymes.

- 1.2. Clonage d'un ADNc codant pour le prepro-BDNF. L'ADNc complet
5 codant pour le prepro-BDNF de rat (790 pb) a été cloné à partir d'une banque d'ADN génomique de rat par la technique de PCR, en utilisant comme amorce les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TTCATCGAATTCCACCAGGTGAGAAG-3' (SEQ ID n°1)

Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3' (SEQ ID n°2)

- 10 La région 5' de la séquence obtenue a ensuite été modifiée par insertion d'un site de restriction ClaI, 25 bases en amont de l'ATG. Ce site a été introduit par PCR au moyen des oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide 5' : 5'-TAGCTTTCATCGATTTCACCAG-3' (SEQ ID n°3)

Oligonucléotide 3' : 5'-AATATAATCTAGACAACATAAATCC-3' (SEQ ID n°4)

- 15 La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNF.

1.3. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNF

- Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNF contenant la
20 séquence codant pour le prepro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

- Le vecteur pCRII-BDNF a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,85 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNF a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting
25 Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 a été digéré par les mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose, et le fragment de 0,85 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNF (figure 2).

30 Exemple 2 : Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Cet exemple décrit la construction d'un second vecteur comprenant une séquence d'ADN de fusion codant pour le BDNF sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

- 2.1. Génération de l'ADN de fusion : Dans cet exemple, une forme alternative de la séquence d'ADN codant pour le prépro-BDNF a été construite. Cette forme a été obtenue par insertion, à l'extrémité 3' terminale de la séquence décrite dans l'exemple 5 1.2., d'une séquence codant pour un épitope de sept acides aminés (tag) reconnu par un anticorps disponible commercialement (IBI, Integra Biosciences, Eaubonne, France). La séquence de la région ainsi fusionnée est la suivante (SEQ ID n°5) :

Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp ***
 10 AGA GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC TAG

C-ter Seq. fusionnée
 BDNF

- 15 La séquence ainsi obtenue a ensuite été sous-clonée dans le plasmide pCRII (Invitrogen) pour générer le plasmide pCRII-BDNFtag.

2.2. Construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag

- Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-BDNFtag contenant la séquence de fusion codant pour le prépro-BDNF sous contrôle du LTR du virus RSV,
 20 ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

- Le vecteur pCRII-BDNFtag a été digéré par les enzymes ClaI et KpnI, et le fragment de 0,87 kb résultant, contenant la séquence codant pour le prépro-BDNFtag a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 (exemple 1.1.) a été digéré par les
 25 mêmes enzymes de restriction ClaI et KpnI, puis précipité après inactivation de ces dernières. Le vecteur linéaire résultant, préalablement isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose, et le fragment de 0,87 kb ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

30 Exemple 3. Fonctionnalité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag

La capacité des vecteurs pSh-Ad-BDNF et pSh-Ad-BDNFtag à exprimer sur culture cellulaire une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par transfection transitoire de cellules COS1. Pour cela, les cellules (2.10⁶ cellules par

boite de 10 cm de diamètre) ont été transfectées (8 µg de vecteur) en présence de Transfectam. Après 48 heures, le surnageant de culture des cellules a été récolté. Des dilutions sérielles (1/200 et 1/50) de ce surnageant ont ensuite été ajoutées à des cultures primaires de neurones du septum (Hefti et al. In Dissection and Tissue
5 cultures : Manual of the Nervous System (1989) 172, Alan R. Liss, Inc). L'effet trophique (survie cellulaire et pousse neuritique) sur ces cultures a été observé après coloration, et l'effet différentiateur par dosage de l'expression de l'enzyme choline acétyl transférase (ChAT), selon la technique décrite par Fonnum (J. Neurochem. 24 (1975) 407).

10 Exemple 4. Construction des adénovirus recombinants contenant une séquence codant pour le BDNF

4.1. Construction de l'adénovirus Ad-BDNF

Le vecteur pSh-Ad-BDNF a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les
15 fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

Plus précisément, l'adénovirus Ad-BDNF a été obtenu par recombinaison homologue in vivo entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pSh-Ad-BDNF, selon le protocole suivant : le plasmide pSh-Ad-BDNF et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-
20 transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus déficient recombinant non purifié ayant un titre
25 d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-BDNF peut être conservé à -80°C dans 20 % de glycérol.

30

4.2. Construction de l'adénovirus Ad-BDNFtag

L'adénovirus Ad-BDNFtag a été construit selon le même protocole que l'adénovirus Ad-BDNF, mais en utilisant comme vecteur de départ le vecteur pSh-Ad-BDNFtag.

Exemple 5. Fonctionnalité de l'adénovirus Ad-BDNF

5 La capacité de l'adénovirus Ad-BDNF à infecter des cellules en culture et à exprimer dans le milieu de culture une forme biologiquement active du BDNF a été démontrée par infection des lignées 293 humaine et PC12 de rat. La présence de BDNF actif dans le surnageant de culture a ensuite été déterminée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 3.

10 Ces études permettent de montrer que l'adénovirus exprime bien une forme biologiquement active du BDNF en culture cellulaire.

Exemple 6 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion du fimbria-fornix

15 Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion du fimbria-fornix, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

20 Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie septo-hippocampique (fimbria-fornix) a été sectionnée au niveau de l'hémisphère gauche. Cette lésion mécanique a été réalisée à l'aide d'un couteau chirurgical rétractable. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au bregma : AP : -1,7; ML : +1,5; V : -5,5 à -0,5.

25 L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans le noyau médian du septum et dans la partie dorsale de l'hippocampe déafférenté (hippocampe du côté de la lésion). Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

30 Les injections sont réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les

volumes d'injection dans l'hippocampe et le septum sont respectivement 3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

5 Pour l'injection dans l'hippocampe, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-4; ML=3,5; V=-3,1 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma.

10 Pour l'injection dans le septum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=1; ML=1; V=-6 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au niveau du bregma. Dans cette condition, la canule présente un angle de 9 degrés par rapport à la verticale (dans le sens médio-latéral) afin d'éviter le sinus veineux médian.

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

15 Analyse histologique et immunohistochimique

La lésion mécanique du fimbria-fornix induit une perte de neurones cholinergiques (révélée en immunohistologie par un anticorps anti-choline acétyl transférase, ChAT) dans le septum médian, ainsi que la dénervation cholinergique dans l'hippocampe (détectée en histochimie par l'activité de l'acétyl choline estérase, AChE).

5 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF. Pour cela, les animaux sont sacrifiés, sous anesthésie, par perfusion intracardiaque de 4% paraformaldéhyde. Après
10 prélèvement, post-fixation et cryoprotection, le cerveau est coupé au cryomat selon le plan coronal : des coupes sériées coronales de 30 µm d'épaisseur sont réalisées sur toute la longueur du septum médian et aux niveaux antérieur, médian et postérieur de l'hippocampe. Pour le septum médian, des coupes espacées de 180 µm (1 coupe sur 6) sont colorées au crésyl violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par un anticorps anti ChAT (Biochem) (pour identifier les neurones cholinergiques). La méthode immunohistochimique est celle de la streptavidine-biotine peroxydase
15 révélée par la DAB. Pour l'hippocampe, des coupes espacées de 180 µm sont colorées selon la méthode histochimique pour l'AChE (acétyl choline estérase) afin de détecter l'innervation cholinergique. Les coupes sont montées sur lames de verre.

Analyse quantitative

Le nombre de neurones cholinergiques (ChAT positifs) dans le septum
20 médian est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur du septum médian). Pour chaque coupe, les neurones ChAT positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés du septum. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés par le rapport du nombre de neurones ChAT positifs du côté lésé sur le
25 nombre de neurones ChAT positifs du côté non lésé.

Analyse comportementale

Il est connu qu'une lésion bilatérale de la voie septo-hippocampique conduit à des déficits mnésiques. Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur ce type de lésion, les performances mnésiques des animaux
30 sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la piscine de Morris (mémoire de référence visuo-spatiale) et le test TMTT ("two-trials memory task"; "mémoire à court-terme d'un environnement nouveau").

Exemple 7 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie nigro-striée

Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie nigro-striée, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie nigro-striée a été lésée au niveau du faisceau mésencéphalique médian (MFB) par injection de la toxine 6-hydroxy dopamine (6OH-DA). Cette lésion chimique par injection a été unilatérale, suivant les coordonnées stéréotaxiques suivantes : AP : 0 et -1; ML : +1,6; V : -8,6 et -9 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère). La barre d'incisive est fixée au niveau +5 mm.

L'adénovirus recombinant BDNF a été injecté immédiatement après la lésion, dans la substance noire et le striatum, du côté de la lésion. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans le striatum et la substance noire sont respectivement 2x3 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Pour l'injection dans la substance noire, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-5,8; ML=+2; V=-7,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

Pour les injections dans le striatum, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=+0,5 et -0,5; ML=3; V=-5,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la dure-mère).

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention ont été mis en évidence par trois types d'analyse : une analyse histologique et immunohistochimique, une analyse quantitative et une analyse comportementale.

Analyse histologique et immunohistochimique

La lésion chimique de la voie nigro-striée induit une perte neuronale dans la substance noire ainsi que la dénervation dopaminergique dans le striatum (révélées en immunohistologie par un anticorps anti-tyrosine hydroxylase, TH).

- 5 L'analyse histologique des cerveaux injectés est réalisée 3 semaines après l'injection intracérébrale de l'adénovirus Ad-BDNF dans les conditions décrites dans l'exemple 6. Les coupes sériées coronales de 30 μ m d'épaisseur sont réalisées dans la substance noire et le striatum. Des coupes espacées de 180 μ m (1 coupe sur 6) sont colorées au crésyl violet (pour évaluer la densité neuronale) et immunomarquées par
- 10 un anticorps anti tyrosine hydroxylase (TH) (pour détecter les neurones dopaminergiques dans la substance noire et leur innervation dans le striatum).

Analyse quantitative

- Le nombre de neurones dopaminergiques (TH positifs), dans la substance noire est le paramètre d'évaluation des effets de l'adénovirus Ad-BDNF. Le
- 15 dénombrement est réalisé sur un échantillon (1 coupe sur 6 sur toute la longueur de la substance noire). Pour chaque coupe, les neurones TH positifs sont dénombrés séparément des 2 cotés de la substance noire. Les résultats cumulés pour toutes les coupes sont exprimés en proportion : nombre de neurones TH positifs du côté lésé par rapport au nombre de neurones TH positifs du côté non lésé.

20 Analyse comportementale

- Afin d'évaluer les effets fonctionnels protecteurs d'une injection d'adénovirus Ad-BDNF sur la lésion de la voie nigro-striée, les performances sensori-motrices des animaux sont analysées au cours de 2 tests comportementaux : le test de la rotation induite par des agonistes dopaminergiques (apomorphine, amphétamine et lévodopa),
- 25 et le test de préhension ("paw-reaching").

Exemple 8 : Transfert in vivo du gène BDNF par un adénovirus recombinant à des rats présentant une lésion de la voie perforante

- Cet exemple décrit le transfert du gène BDNF in vivo au moyen d'un vecteur adénoviral selon l'invention. Il montre sur un modèle animal de la lésion de la voie
- 30 perforante, que les vecteurs de l'invention permettent d'induire l'expression in vivo de quantités thérapeutiques de BDNF.

Sur des rats préalablement anesthésiés, la voie entorhino-hippocampique (voie perforante) a été sectionnée unilatéralement à l'aide d'un couteau chirurgical. Les coordonnées stéréotaxiques utilisées à cet effet sont, par rapport au lambda : AP : +0,75; ML : +4,1 à 6,6; V : -7,7 (coordonnée V déterminée par rapport à la dure-mère).

L'adénovirus recombinant BDNF est injecté immédiatement après la lésion, soit au niveau de la lésion, soit au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal. Plus particulièrement, l'adénovirus injecté est l'adénovirus Ad-BDNF préparé dans l'exemple 4.1., utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

Les injections ont été réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être remontée. Les volumes d'injection dans l'hippocampe, le cortex entorhinal et le site de lésion de la voie perforante sont respectivement 3 μ l, 2 μ l et 2 μ l. La concentration d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Les effets thérapeutiques de l'administration de l'adénovirus selon l'invention peuvent être mis en évidence par une analyse comportementale dans les conditions de l'exemple 6.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

5

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
(B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
(C) VILLE: ANTONY
(E) PAYS: FRANCE
(F) CODE POSTAL: 92165

10

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Virus recombinants, préparation et utilisation en thérapie génique

15

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 5

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

25

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 26 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii), ANTI-SENS: NON

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

TTCATCGAAT TCCACCAGGT GAGAAG

26

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

40

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 25 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

45

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

AATATAATCT AGACAACATA AATCC

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

55

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 22 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple

60

22

(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(iii) HYPOTHETIQUE: NON
5 (iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

TAGCTTCATC GATTTCCACC AG

22

10 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 25 paires de bases
15 (B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
20 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

AATATAATCT AGACAACATA AATCC

25

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
30 (B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: double
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
35 (iii) HYPOTHETIQUE: NON
(iii) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

40 AGA GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC TAG
Arg Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp ***
1 5

30

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) ou un dérivé de celui-ci.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF.
3. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNc.
4. Adénovirus selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est une séquence d'ADNg.
5. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN code pour le prépro-BDNF humain.
6. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules nerveuses.
7. Adénovirus selon la revendication 6 caractérisé en ce que les signaux d'expression sont choisis parmi les promoteurs viraux, de préférence parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
8. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
9. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNg codant pour le prépro-BDNF humain sous le contrôle du promoteur LTR-RSV.
10. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour le facteur neurotrophique dérivé du cerveau humain (hBDNF) ou un dérivé de celui-ci sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules nerveuses.
11. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 10 caractérisé en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur de l'énolase neurone spécifique et le promoteur de la GFAP.

12. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.

5 13. Adénovirus selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il comprend les ITR et une séquence permettant l'encapsidation, et dans lequel le gène E1 et au moins un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels.

14. Adénovirus selon la revendication 12 ou 13 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad 2 ou Ad 5 ou canin de type CAV-2.

10 15. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 14 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention des maladies neurodégénératives.

16. Utilisation selon la revendication 15 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement et/ou à la prévention de la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, de Huntington ou de l'ALS.

15 17. Composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

18. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 caractérisée en ce qu'elle est sous forme injectable.

20 19. Composition pharmaceutique selon la revendication 17 ou 18 caractérisée en ce qu'elle comprend entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml adénovirus recombinants défectifs.

20. Cellule de mammifère infectée par un ou plusieurs adénovirus recombinants défectifs selon l'une des revendications 1 à 14.

25 21. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine.

22. Cellule selon la revendication 20 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule humaine de type fibroblaste, myoblaste, hépatocyte, cellule endothéliale, cellule gliale ou kératynocyte.

23. Implant comprenant des cellules infectées selon les revendications 20 à 22 et une matrice extracellulaire.

24. Implant selon la revendication 23 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant choisi de préférence parmi le collagène, la gélatine, les glucosaminoglycans, la fibronectine et les lectines.

25. Implant selon les revendications 23 ou 24 caractérisé en ce que la matrice extracellulaire comprend également un support permettant l'ancrage des cellules infectées.

26. Implant selon la revendication 25 caractérisé en ce que le support est constitué préférentiellement par des fibres de polytétrafluoroéthylène.

1/2

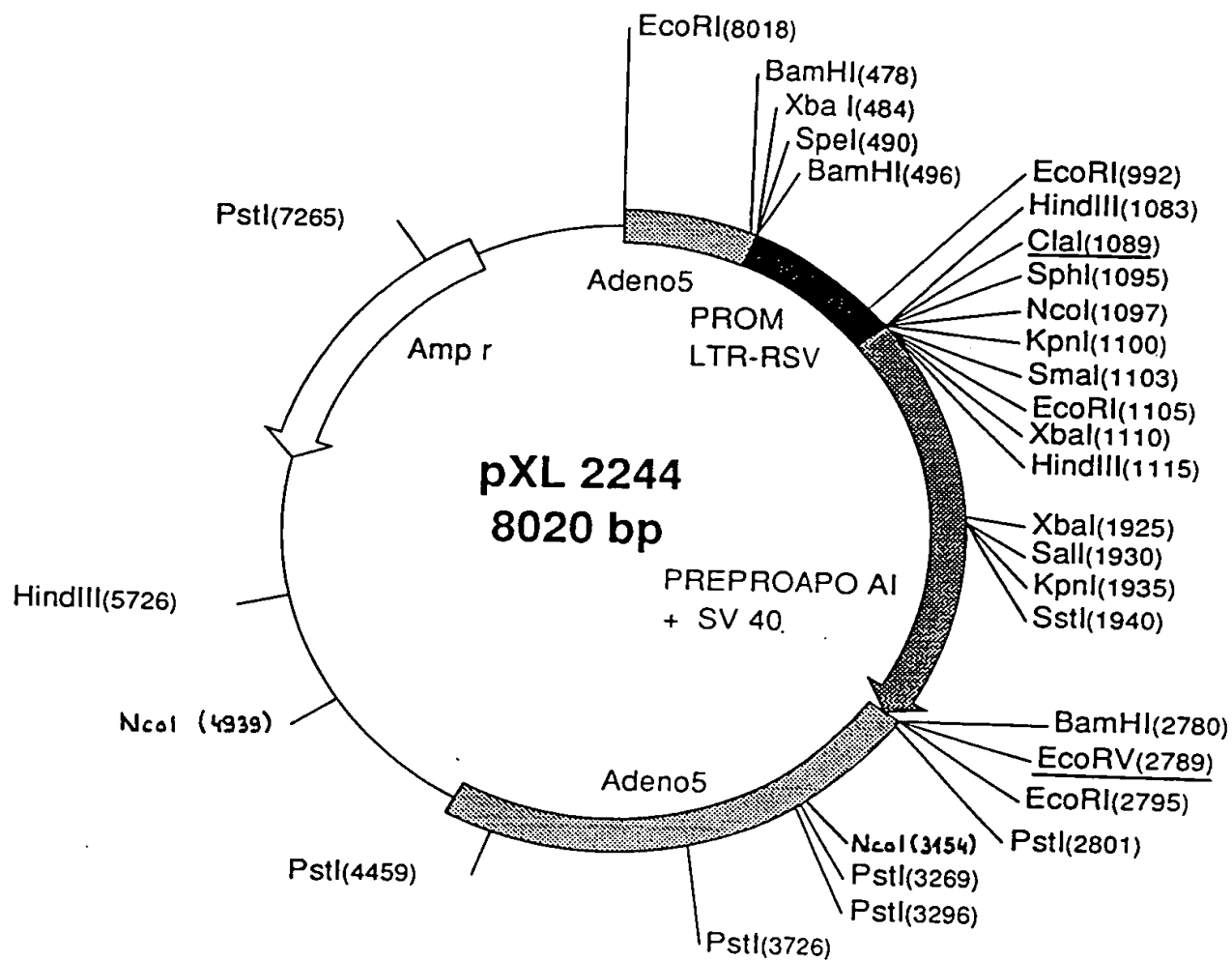


Figure 1

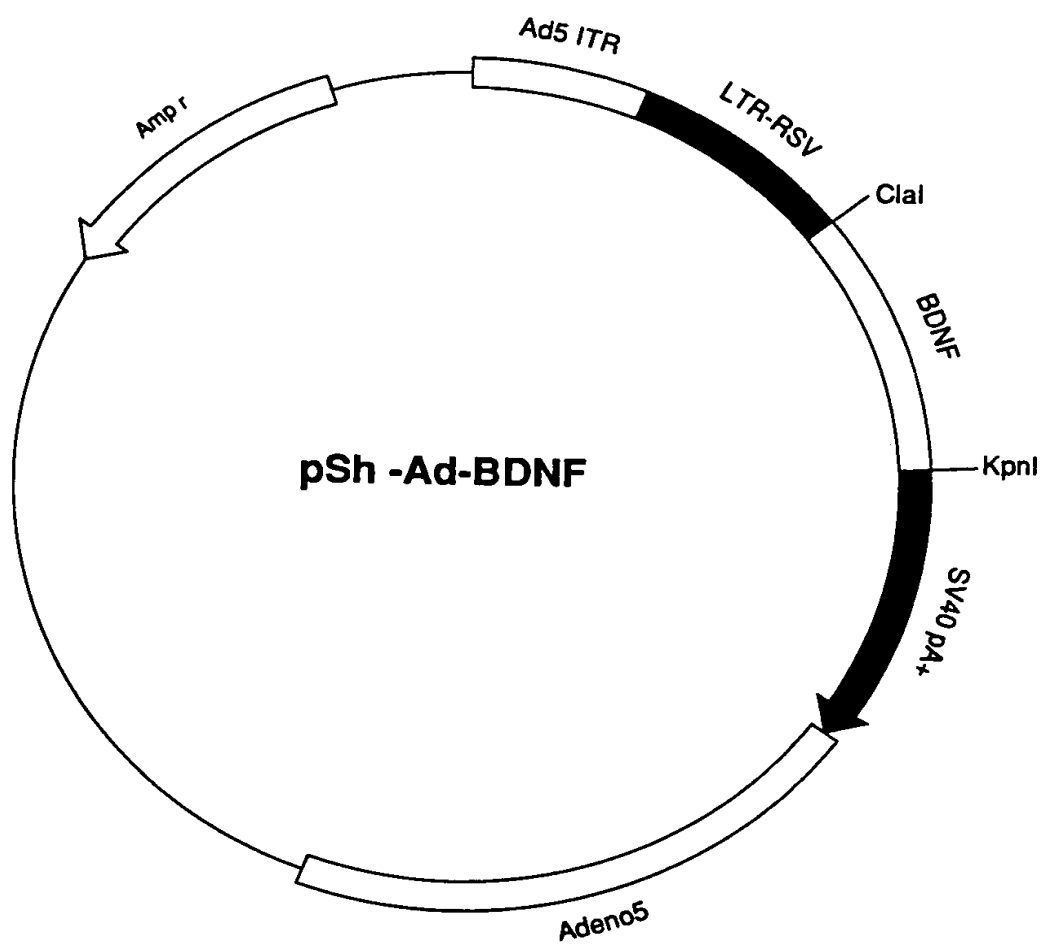


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/00250

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C07K14/475 C12N7/01
C12N5/10 A61K39/235

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SCIENCE, vol.259, 12 February 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' see the whole document --- -/--</p>	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 May 1995

Date of mailing of the international search report

09.06.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat I Application No

PCT/FR 95/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' see the whole document	1-26
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1er au 3 Juin 1993 ---	1-26
P,Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 March 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,94 03199 (REGENERON PHARM. INC.) 17 February 1994 see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,93 08828 (GENERAL HOSPITAL CORP. & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 May 1993 see the whole document ---	1-26
Y	WO,A,93 01300 (MAX PLANCK GES. FÖRDERUNG WIISE & REGENERON PHARM INC.) 21 January 1993 see the whole document ---	1-26
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 September 1993 see claims ---	1-26
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 April 1994 see the whole document ---	1-26
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, February 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organes vascularisés' see the whole document ---	1

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 95/00250

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, September 1992, AMSTERDAM NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' see page 218, column 2, paragraph 3 - page 219, column 1, paragraph 1 ---</p>	1
T	<p>WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 27 October 1994 see the whole document ---</p>	1
A	<p>BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' see the whole document ---</p>	1
A	<p>SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 June 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' see the whole document -----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/00250

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9403199	17-02-94	AU-B-	4995193	03-03-94
WO-A-9308828	13-05-93	AU-A-	3129793	07-06-93
WO-A-9301300	21-01-93	AU-A-	2009592	11-02-93
		CA-A-	2113083	11-01-93
		EP-A-	0593516	27-04-94
		FI-A-	940098	10-03-94
		JP-T-	6509094	13-10-94
		NO-A-	940083	18-02-94
		NO-A-	940084	08-03-94
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B-	3757093	21-10-93
		CA-A-	2102302	17-09-93
		EP-A-	0593755	27-04-94
		WO-A-	9319191	30-09-93
		HU-A-	66486	28-11-94
		JP-T-	6508039	14-09-94
		NO-A-	934061	09-11-93
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B-	4818093	26-04-94
		NO-A-	951121	23-03-95
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A-	2704234	28-10-94
		AU-B-	6572194	08-11-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 95/00250

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12N15/86 A61K48/00 C12N15/12 C07K14/475 C12N7/01
C12N5/10 A61K39/235

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K C07K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SCIENCE, vol.259, 12 Février 1993, LANCASTER, PA US pages 988 - 990 LE GAL LA SALLE, G. ET AL. 'An adenovirus vector for gene transfer into neurons and glia in the brain' voir le document en entier --- -/--	1-26

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 Mai 1995

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

- 9. 06. 95

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' voir le document en entier	1-26
O,Y	& XIIth congrès de la société française d'hématologie, Strasbourg, France 1er au 3 Juin 1993 ---	1-26
P,Y	NEUROREPORT, vol.5, no.7, 21 Mars 1994 pages 801 - 804 RIDOUX, V. ET AL. 'The use of adenovirus vectors for intracerebral grafting of transfected nervous cells' voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,94 03199 (REGENERON PHARM. INC.) 17 Février 1994 voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,93 08828 (GENERAL HOSPITAL CORP. & SYNTEX-SYNERGEN NEUROSCIENCE JOINT VENTURE) 13 Mai 1993 voir le document en entier ---	1-26
Y	WO,A,93 01300 (MAX PLANCK GES. FÖRDERUNG WIISE & REGENERON PHARM INC.) 21 Janvier 1993 voir le document en entier ---	1-26
Y	FR,A,2 688 514 (CNRS) 17 Septembre 1993 voir revendications ---	1-26
P,Y	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 Avril 1994 voir le document en entier ---	1-26
A	MEDECINE /SCIENCES, vol.9, no.2, Février 1993 pages 208 - 210 DANOS, O. ET AL. 'Réimplantation de cellules génétiquement modifiées dans des néo-organs vascularisés' voir le document en entier ---	1
	--- -/--	

C(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol.208, no.2, Septembre 1992, AMSTERDAM NL pages 211 - 225 ROEMER, K. & FRIEDMANN, T. 'Concepts and strategies for human gene therapy' voir page 218, colonne 2, alinéa 3 - page 219, colonne 1, alinéa 1 ---	1
T	WO,A,94 24297 (RHONE-POULENC RORER S.A. ET AL.) 27 Octobre 1994 voir le document en entier ---	1
A	BRAIN RESEARCH, vol.648, no.1, 1994 pages 171 - 175 RIDOUX, V. ET AL. 'Adenoviral vectors as functional retrograde neuronal tracers' voir le document en entier ---	1
A	SCIENCE, vol.256, no.5063, 12 Juin 1992, LANCASTER, PA US pages 1550 - 1552 CULVER, K. W. ET AL. 'In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors' voir le document en entier -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document internationale No

PCT/FR 95/00250

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevets	Date de publication
WO-A-9403199	17-02-94	AU-B- 4995193	03-03-94
WO-A-9308828	13-05-93	AU-A- 3129793	07-06-93
WO-A-9301300	21-01-93	AU-A- 2009592	11-02-93
		CA-A- 2113083	11-01-93
		EP-A- 0593516	27-04-94
		FI-A- 940098	10-03-94
		JP-T- 6509094	13-10-94
		NO-A- 940083	18-02-94
		NO-A- 940084	08-03-94
FR-A-2688514	17-09-93	AU-B- 3757093	21-10-93
		CA-A- 2102302	17-09-93
		EP-A- 0593755	27-04-94
		WO-A- 9319191	30-09-93
		HU-A- 66486	28-11-94
		JP-T- 6508039	14-09-94
		NO-A- 934061	09-11-93
WO-A-9408026	14-04-94	AU-B- 4818093	26-04-94
		NO-A- 951121	23-03-95
WO-A-9424297	27-10-94	FR-A- 2704234	28-10-94
		AU-B- 6572194	08-11-94